Aus dem hygienischen Institut der Universität Greifswald.

Über die Anwendung gefärbter Nährböden zum Nachweise des Typhusbacillus.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

in der

Medizin, Chirurgie und Geburtshülfe,

welche

nebst beigefügten Thesen

mit Zustimmung der Hohen Medizinischen Fakultät der Königlichen Universität zu Greifswald

am

Sonnabend, den 1. April 1899,

Mittags 1 Uhr

öffentlich verteidigen wird

Carl Deichsel

aus Oppeln.

Opponenten:

Herr cand. med. Kaps.

Herr Dr. med. Schildmacher, Cursist.

Greifswald.

Druck von Julius Abel.

1899.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154003_0033

Seinem lieben Vater

in Dankbarkeit

gewidmet

vom

Verfasser.

Eine der undankbarsten Aufgaben des Bakteriologen ist unstreitig die Untersuchung typhusverdächtigen Wassers. Die Schwierigkeit liegt hauptsächlich in der grossen Menge der typhusähnlichen Bakterien, die sich in den Wässern finden. Man suchte daher zunächst Substanzen zu finden, die dem zu untersuchenden Wasser oder dem damit besäten Nährboden zugesetzt möglichst viele Wasserbakterien ausschalteten, ohne den Typhusbazillus abzutöten. Die nach diesem Prinzipe von Widal und Chantemesse angegebene Carbolgelatine*) hat sich wie Holz dargethan nicht bewährt. Ein besseres doch nicht befriedigendes Resultat gab das von Thoinot angegebene und von Holz verbesserte Verfahren, durch Zusatz von 0,25 ccm Carbolsäure auf 100 ccm Wasser die störenden Wasserbakterien zu entfernen. Doch schädigt die Carbolsäure auch die Typhuskeime, sodass diese Methode nur bei hochinfektiösen Wässern Aussicht auf Erfolg hat. Von demselben Gedanken der relativen Widerstandsfähigkeit der Typhuskeime gegen Säuren ausgehend versuchte Uffelmann mit Citronensäure versetzte und mit Methylviolet gefärbte Gelatine. Auch er verfiel in den Fehler, Colikolonieen für Typhus gehalten und die grosse Widerstandsfähigkeit des Bacterium Coli gegen Säuren übersehen zu haben.

Einen Schritt weiter gingen nun jene Forscher, welche mit Beibehaltung des Prinzipes der Ausschaltung der störenden Bakterien das Prinzip der Anreicherung verbanden. Rodet

*) Vergl. hiezu und zu den übrigen Wasseruntersuchungsmethoden: Loeffler, das Wasser und die Mikroorganismen, wo auch genauere Litteraturangabe.

benutzte hierzu die Eigenschaft des Typhusbacillus, in einer Temperatur von 45,0° bei welcher die meisten Wasserbakterien gehemmt werden, noch wachsen zu können, und es gelang ihm Typhuskeime aus Wasser in gewöhnlicher Bouillon bei dieser Temperatur anzureichern. Vincent erreichte dasselbe durch Zusatz von 0,7‰ Carbolsäure zu je 10 ccm Peptonbouillon und eine Brüttemperatur von 42°. Durch mehrmaliges Anreichern gelang es ihm so in der That, zweimal im Seinewasser Typhus nachzuweisen. Zweifelhaft dagegen erscheinen die Erfolge, die Pariett, durch Anreicherung in Bouillon mit geringem Carbol- und Salzsäurezusatz erzielt haben will. Es ist nachgewiesen worden, dass Bacterium Coli viel widerstandsfähiger gegen Carbol- und Salzsäurezusatz ist, wie der Typhusbacillus. Denselben Mangel hatte das von Peré angegebene Anreicherungsverfahren mit Carbolpeptonbouillon, die in grossen Mengen angewendet einen grösseren Wasserzusatz ermöglichte. Der geringe Erfolg der Carbolmethode veranlasste Rawitsch—Stscherba andere Substanzen zu versuchen. Es gelang ihm durch Anreichern in mit 0,1 ‰ α Naphtol versetzter Bouillon den Typhusbacillus von Wasserbakterien und Bakterium coli zu isolieren. Auch dies Verfahren hat der Nachprüfung nicht standhalten können, wahrscheinlich wegen der grossen Verschiedenheiten der Coliarten; Rawitsch—Stcherba hatte mit wenig widerstandsfähigen Colibacillen gearbeitet, seinen Nachprüfern standen Colistämme von grösserer Lebenskraft zur Verfügung.

Die ganze Frage des Typhusnachweises hat sich allmählich zu folgenden zwei Forderungen zugespitzt:

1. Es soll ein Nährboden gefunden werden, in dem der Typhusbacillus charakteristische, leicht unterscheidbare Colonieen bildet.
2. Es ist eine Substanz zu finden, die das Wachstum der typhusähnlichen Bakterien und besonders des Hauptrepräsentanten derselben das Bacterium coli derart

hemmt, dass eine Anreicherung der Typhuskeime möglich ist ähnlich der Anreicherung des Cholerabacillus durch Peptonwasser.

Der ersten Forderung genügt bis jetzt wohl am besten die von Holz*) angegebene natursaure Kartoffelgelatine, in welcher die natürliche organische Säure eine langsamere Entwiklung und Bildung heller kleiner Kolonieen des Typhusbacillus gegenüber dem schneller wachsenden und grosse graubraune Kolonieen bildenden Bacterium coli bewirkt und dadurch eine leidlich sichere Unterscheidung gestattet. Elsner glaubte diese Gelatine durch Zusatz von 1% Jodkalium verbessert und eine sichere Unterscheidung ermöglicht zu haben. Die Erfahrungen, die mit diesem Nährboden im hiesigen hygienischen Institute gemacht worden sind, haben ergeben, dass der Elsnerschen Gelatine keine Vorzüge vor der Holzschen Kartoffelgelatine zuzuerkennen sind; und wir müssen uns daher mit dieser behelfen, trotzdem sie die beiden grossen Nachteile hat, dass sie das Wachstum der Typhuskeime behindert und durchaus nicht immer konstant jene Vorzüge besitzt. Auch um der zweiten Anforderung zu genügen, eine Vorkultur zu ermöglichen, erscheint der Kartoffelsaft als eine den Anforderungen mit am besten entsprechende Substanz. Es werden 100 ccm des zu untersuchenden Wassers mit 10 ccm frisch bereiteten sterilen Kartoffelsaftes versetzt, dessen natürlicher Säuregrad einem Gehalt von 0,1 % Salzsäure entspricht. Nach 8 bis 12 Stunden Aufenthalt im Brutschrank werden davon Kartoffelgelatineplatten gegossen. Wenn dies Verfahren vielleicht auch das brauchbarste ist, zufriedenstellend ist es deshalb durchaus noch nicht und lässt bei der Untersuchung stärker verunreinigter Gewässer meist im Stich. Am hiesigen Stadtgrabenwasser, in das ein Teil der Strassenabwässer entleert wird, sind bisher sämtliche Methoden gescheitert. Deshalb sind seit Jahren im

*) Zeitschrift für Hygiene Bd. VIII. S. 150.

hiesigen hygienischen Institute Versuche angestellt worden um jene Frage der Lösung näher zu bringen und jenen oben erwähnten Anforderungen an eine gute Methode des Typhusnachweises zu genügen.

Der eine Weg dies zu erreichen bestand in der Benutzung gefärbter Nährböden. Der Gedanke, gefärbte Nährböden zur bakteriologischen Differenzialdiagnose zu verwerten, ist in ausgedehnter Weise zuerst von Noeggerath verfolgt worden.*) Er stellte eine Farbmischung dar aus

2	ccm	Methylenblaulösung	+ 25	ccm	Wasser
4	„	Gentianavioletlösung	+ 50	„	„
1	„	Methylgrünlösung	+ 12,5	„	„
4	„	Chrysoidinlösung	+ 50	„	„
5	„	Fuchsinlösung	+ 62,5	„	„

Von dieser Mischung werden 5—10 Tropfen zu 10 ccm Gelatine zugesetzt und Strichkulturen angelegt.

Es zeigt sich nun, dass die Bakterien in ihrer Umgebung die Gelatine entfärben in der Weise, dass allmählich eine Farbe nach der andern ausgeschaltet wird und die übrig bleibenden Farben zum Vorschein kommen. Je nach der Reihenfolge der Ausschaltung erhalten wir nun zuweilen für einzelne Bakterien charakteristische Farbenspiele. Dies Verfahren ist von Grancher und Deschamps und von Holz**) zur Differenzialdiagnose zwischen Typhus und Typhusähnlichen versucht worden. Zugleich wurden die einzelnen Componenten der Farbmischung versucht und zwar mit festen wie mit flüssigen Nährböden. Die Versuche mit festen Nährböden lieferten kein typisches Resultat. In flüssigen Nährböden zeigten sich folgende charakteristische Farbenveränderungen: In mit Noeggerathscher Mischung gefärbter (10 Trpf. auf 5 ccm) und mit Typhusbacillen besäter Bouillon von schwach saurer Reaktion

*) Fortschritte der Medizin 1880.

**) Zeitschrift für Hygiene VIII.

wurde die Farbe nach 8 Stunden blaugrün und ging allmählich mehr ins blaue über, die typhusähnlichen Wasserbakterien bildeten in der gefärbten Bouillon nach 18 Stunden eine bräunliche Farbe mit blauen Wolken, die nach 16 Stunden blauviolett wurde. In der mit Typhus beimpften nach Noeggerath gefärbten Milch zeigte sich nach 2 Tagen ein schmutzig roter Bodensatz und die Farbe wurde allmählich rotviolett. Dies Verhalten kann ein wertvolles differenzialdiagnostisches Hilfsmittel zwischen Typhusbacillen und ähnlichen Bakterien abgeben.

Weitere Versuche mit gefärbten Nährboden wurden von Uffelmann gemacht. Er färbte mit Pikrinsäure angesäuerte Gelatine mit Methylviolett und wollte darin den Typhusbazillus in charakteristischen blau gefärbten Colonieen gesehen haben. Bei einer Nachprüfung jedoch stellte es sich heraus, dass die vermeintlichen Typhuskolonien Colikolonieen waren. In jüngster Zeit ist von Rothberger im Centralblatt für Bakteriologie etc. eine Arbeit erschienen, in welcher über das Wachstum von Bacterium Typhi und Bacterium Coli auf gefärbtem Agar berichtet wurde. Es hatte sich eine für Coli charakteristische Fluorescenzreaktion auf Neutralrot und Safraninagar ergeben. Angenommen, dass diese Reaktion als charakteristisch sich bestätigen werde, so hat dieselbe doch für die Wasseruntersuchung nur geringen Wert, weil Rothberger Strichculturen anlegt, während es bei der Wasseruntersuchung darauf ankommt, Typhus und Coli in einzelnen Colonieen von einander zu unterscheiden. Neutralrot und Safranin sind von mir übrigens auch in Galatineplatten mit einzelnen Colonieen versucht worden, worüber ich später berichte.

Ich komme nun auf die Versuche, welche im hiesigen hygienischeu Institut mit gefärbten Nährböden angestellt worden sind. Vor zwei Jahren begann Dr. Hofschläger im grössten Stile angelegte Untersuchungen über das Verhalten von Bacterium Typhi und Bacterium Coli zu gefärbten Nährböden. 70 verschiedene Farbstoffe standen ihm zur Verfügung. Von

diesen wurden 52 in stark verdünnter Peptonbouillon teils mit theils ohne Zusatz von 3 % Glycerin versucht. Diese zunächst etwas skizzenhaft angelegten Versuche hatten die Absicht, einen Ueberblick über die Verwertbarkeit des Farbenmaterials zu gewinnen. Eine beschränkte Anzahl der so versuchten Farben d. h. diejenigen, welche sich als aussichtsvoll bewährt hatten, wurden nun mit den verschiedensten festen Nährböden versucht. Das allgemeine Resultat der Versuche mit gefärbter Bouillon war, dass sich ein Zusatz von 3 % Glycerin als vorteilhaft erwies. Zugleich hatte sich andeutungsweise das sehr beachtenswerte Resultat gezeigt, dass einige Farbstoffe einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum von Bacterium coli ausübten, ohne den Typhusbacillus zu schädigen; besonders das Azogelb schien diese Wirkung zu haben, was sich jedoch bei genauer Untersuchung nicht bestätigte. Ueber die Versuche mit gefärbten festen Nährboden will ich hier nur bemerken, dass nur gefärbte Gelatineplatten Aussicht auf Erfolg versprachen. Genaueres darüber berichte ich später bei meinen eigenen Versuchen mit gefärbten Gelatineplatten. Diese mit grossartiger Systematik angelegten Versuche Dr. Hofschlägers sind aus äusseren Gründen nicht zu Ende geführt. Meine Aufgabe war es, dieselben weiter zu führen, sie zu Ende zu bringen durfte ich in der mir gebotenen Zeit nicht erwarten. Meine Arbeit war eine wesentlich dankbarere insofern als so zu sagen die Pionierarbeit schon gethan war: eine Anzahl Farbstoffe schieden ohne weiteres aus, weil sie nicht wasserlöslich waren, weil sie den Nährboden unbrauchbar machten etc. Es blieb so die Aufmerksamkeit auf eine beschränkte Anzahl von Farbstoffen gerichtet. Diese waren zu untersuchen und besonders die Concentration ihrer besten Wirksamkeit zu ermitteln. Auch ich arbeitete zuerst mit flüssigen Nährböden und ging darauf zu festen über, bei letzteren mit dem Gedanken ein differenzialdiagnostisches Moment zu finden, bei den ersteren in der Absicht eine Sub-

stanz ausfindig zu machen, die ein Anreicherungsverfahren in Aussicht stellte.

Es handelte sich zunächst nun darum eine möglichst geeignete Bouillon zu finden. Dieselbe hatte zwei Anforderungen zu genügen, erstens musste der Typhus Bacillus darin gut gedeihen. Hierzu erschien mir eine schwache natursaure Reaktion förderlich. Zweitens die Bouillon musste möglichst wenig eigene Farbe besitzen, um die Färbung reiner zu gestalten. Dieser Forderung schien eine starke Verdünnung mit Wasser und die Verwendung möglichst farblosen Fleisches z. B. Kalbfleisches zu genügen. Nach diesen Grundsätzen wurde eine Nahrbouillon aus folgender Zusammensetzung hergestellt: 1 Kg. Kalbfleisch auf 6 L. Wasser, dazu 1 % Pepton und 3 % Glycerin, die Bouillon wird garnicht neutralisiert und zeigt eine ganz schwache natursaure Reaktion. In kleine Röhrchen von 10 cm Länge und 8 mm Durchmesser wurden je 3 ccm dieser Bouillon abgefüllt und sterilisiert — das geringe Caliber der Röhrchen ermöglicht bessere Durchsichtigkeit und genauere Beobachtung. Die Farbstoffe wurden in wässrigen Lösungen angewandt. Concentrierte Lösungen erschienen nicht beständig und präcise genug, deshalb wurden meist $^1/_2$ % Lösungen hergestellt, die dann durch Kochen im Dampfstrom über $^1/_2$ —$^3/_4$ Stunde hin sterilisiert wurden. Die Erfahrung hat gelehrt, dass diese Sterilisation völlig ausreicht. Die sterilen Farblösungen wurden mittels steriler Pipetten in die Röhrchen tropfenweise übertragen und es wurden ziemlich gleich kalibrierte Pipetten benutzt, bei denen ca. 24 Tropfen auf 1 ccm kamen.

In dieser Weise werden je 3 Bouillonröhrchen mit je 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Tropfen einer $^1/_2$ % Schwarzbraunlösung gefärbt. Dies ist ein ziemlich beständiger leicht wasserlöslicher Farbstoff, der von Leopold Casella & Comp. in Frankfurt a. M. bezogen worden war. Die gefärbten Röhrchen werden gut durchgemischt und von den 3 Röhrchen

mit gleicher Färbungsintensität je eins mit Typhus, eins mit Bacterium Coli besät, während das dritte zur Controle unbesät bleibt, und in den Brutschrank bei 36° gestellt. Nach je 24 Stunden werden die Farben und Wachstumsverhältnisse beobachtet. Am nächsten Tage haben wir folgendes Resultat. In den mit Typhus besäten Röhrchen mit 6—3 Tropfen Farblösung ist noch keine Farbenveränderung eingetreten. In der Concentration von 2 Tropfen ist die Farbe ein wenig, in der geringsten Concentration etwas mehr abgeblasst. Die Coliröhrchen sind alle — mit steigender Concentration gleichmässig geringer — abgeblasst. In allen Röhrchen ist Coli stärker gewachsen wie Typhus. Eine charakteristische Farbenreaktion bieten die Röhrchen Nr. 3, bei denen sich das ziemlich entfärbte Coliröhrchen deutlich von dem unveränderten dunkelbraunen Typhusröhrchen unterscheidet. Nach weiteren 24 Stunden ist der Befund folgender. In den Röhrchen Nr. 1 sind die besäten farblos, die Trübung ist mehr gleichmässig. In den höheren Concentrationen hat gleichmässig aufsteigend Bact. coli mehr entfärbt wie Typhus. Röhrchen No. IV zeigen heute dieselbe Farbenreaktion wie gestern Röhrchen No. III. Weiter aufsteigend sind die Typhusröhrchen minimal oder garnicht entfärbt, während die Coliröhrchen weiter abblassen. B.-Coli ist überall stärker gewachsen wie Typhus. Am dritten Tage ist der Befund folgender. In den Röhrchen No. I—IV sind die besäten farblos. In der Concentration No. V ist das Typhus- und das Coliröhrchen stark abgeblasst, jedoch das letztere bedeutend mehr wie das erstere. Nun zeigen Röhrchen No. VI eine sehr schöne Farbenreaktion. Das schwarzbraune Typhusröhrchen sticht grell ab von dem ziemlich farblosen Coliröhrchen. In den entfärbten Röhrchen ist die Trübung ziemlich gleich. Am vierten Tage sind die besäten Röhrchen bis zur Concentration von 5 Tropfen farblos. Die Farbenreaktion von gestern in den Röhrchen No. VI ist etwas verblasst, und nicht mehr so schön. In den entfärbten Röhrchen ist nun überall Typhus besser gewachsen, mit Ausnahme von

Röhrchen No. 5 wo die Trübung noch gleichmässig ist. Am fünften Tage ist das Resultat ziemlich dasselbe. Die Farbenreaktion ist ziemlich verblasst und nun ist mit Ausnahme des noch gefärbten Röhrchens No. VI überall in den entfärbten Typhus stärker gewachsen wie Coli. Am sechsten Tage zeigt sich folgendes. Die besäten Röhrchen der Concentrationen 1—3 sind völlig, die beiden nächst höheren so gut wie farblos. Röhrchen No. VI zeigt noch leidliche Farbenreaktion. In Röhrchen No. 1—5 ist Typhus stärker gewachsen. Am nächsten 7. Tage ist der Befund ziemlich derselbe. Die Colifarbreaktion ist noch deutlich. Die Wachstumsverhältnisse sind dieselben. Am 8. Tage sind die Trübungsdifferenzen nicht mehr so deutlich. Die Farbenreaktion ist noch erkennbar. Am 9. Tage will es scheinen, als ob nun wieder Bacterium coli stärker zu wachsen anfange, und am 10. Tage ist dieser Befund völlig deutlich, und bleibt es auch in den nächsten 4 Tagen, an denen noch beobachtet wurde, während die Farbenreaktion vom 10. Tage ab ziemlich abgeblasst ist. In den Controlröhrchen hat sich in der ganzen Beobachtungszeit nichts geändert. In den entfärbten Röhrchen zeigt sich ein ganz feiner Farbenniederschlag.

Fassen wir das wichtigste aus diesem Versuch zusammen, so haben wir erstens eine schöne Farbenreaktion, die eventuell zur Differenzialdiagnose des Bacterium Typhi und Bacterium Coli verwertbar ist. Nämlich: Setzt man zu 3 ccm Kalbfleischglycerinbouillon 6 Tropfen einer $^1/_2{}^0/_0$ wässrigen Schwarzbraunlösung und besät ein Röhrchen mit Typhus und ein anderes mit Coli so zeigt das Coliröhrchen nach 3 Tagen eine blassbräunliche Färbung während das Typhusröhrchen intensiv schwarzbraun geblieben ist. Diese Reaktion ist unter allmählicher Abblassung noch nach 7—8 Tagen recht deutlich. Will man die Farbenreaktion schon nach 24 Stunden haben, so setze man nur 3 Tropfen zu. Doch ist dann die Reaktion lange nicht so schön und verschwindet nach drei Tagen. Interessant sind auch die wechselnden Wachstumsverhältnisse

des Typhus- und Colibacillus. Zuerst sieht man, dass der Colibacillus wie im ungefärbten Nährboden stärker wächst, als der Typhusbacillus. Seine stärkere Lebensenergie bekundet auch das schnellere Entfärben. Der Kampf mit dem Farbstoff scheint ihm aber doch geschadet zu haben. So wie er ihn beseitigt hat, scheint er ermüdet und nun wächst der Typhusbacillus stärker. Nach einigen Tagen jedoch hat sich Bacterium Coli wieder erholt, und hat nun wieder wie gewöhnlich die Oberhand.

Mit demselben Farbstoff werden Gelatineschälchen gefärbt und mit Typhus und Coli besät, in der Erwartung, dass Coli in den Colonieen ähnlich wie in der Bouillonkultur den Farbstoff niederschlagen und sich dadurch färben möge. Die Gelatine wird mit der oben erwähnten Kalbfleischglycerinbouillon hergestellt, und derselben durch nicht völliges Neutralisieren annähernd derselbe Säuregrad gegeben. Zugleich wird die Gelatine durch Filtrieren mit Eiweiss so gut wie wasserklar erhalten. Ich stellte an sie dieselben Anforderungen wie an die Bouillon, schwach natursaure Reaktion und Farblosigkeit. Die Färbung wird in derselben Intensität vorgenommen, wie in den Bouillonröhrchen, welche jene Farbenreaktion gezeigt hatten, nämlich indem je 6 ccm Gelatine mit 12 Tropfen der Farblösung versetzt und gut gemischt wurden. Von einer 24stündigen Kalbfleischbouillonkultur von Typhus und Coli wird nun 1 Platinöse mit 3 ccm Bouillon gemischt, und von dieser Mischung eine Platinöse ausgesät. Es wird so ein gefärbtes Schälchen mit Typhus eins mit Coli und eins mit Typhus + Coli hergestellt. Am nächsten Tage zeigen sich in den Platten die Typhuskolonien als kleine Pünktchen die Colikolonien etwas grösser. Am 3. Tage ist der Unterschied sehr markant. Sämtliche Typhuskolonien sind klein, durchsichtig von der Farbe der Platte, die Colikolonien sind sehr gross und intensiv braun gefärbt. Die Oberflächenkolonieen fehlen bei Typhus ganz. In den

nächsten Tagen bleibt der Befund ziemlich derselbe, die Typhuskolonien behalten eine gewisse Kleinheit und Durchsichtigkeit und werden nur leicht chagriniert. Die Colikolonieen werden noch etwas grösser und dunkler, der Unterschied bleibt während der 5 Beobachtungstage noch deutlich, ebenso deutlich wie in gut funktionierender Kartoffelgelatine, mit der jene braune Gelatine viel Ähnlichkeit besitzt. Ob die braune Färbung von Coli durch Farbniederschlag wird, scheint zweifelhaft. Wahrscheinlicher ist, dass die eigene graubraune Farbe der Colonieen in der braunen Gelatine verstärkt wird. Der Hauptunterschied, die Kleinheit der Typhuskolonieen in Verhältnis zu den Colikolonieen scheint auf die natursaure Reaktion der Gelatine zu beziehen sein, da die Erfahrung gelehrt hat, das der Typhusbacillus Säure schlechter verträgt wie Coli.

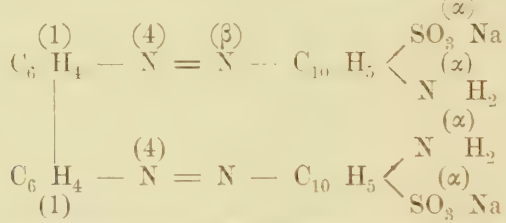
II. Methylorange ein leicht wasserlöslicher, ziemlich haltbarer Farbstoff, welcher von den Höchster Farbwerken bezogen worden war, das Natriumsalz der Dimethylamidoazobenzolsulfosäure:

$$C_6\ H_4 \begin{cases} (4)\ SO_3\ Na \\ (1)\ N = N - C_6\ H_4\ N\ (CH_3)_2. \end{cases}$$

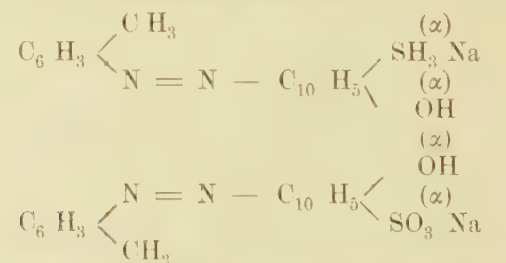
Es werden je drei Röhrchen mit 2, 3, 4, 5 und 6 Tropfen einer concentrierten wässrigen Lösung gefärbt in derselben Weise, mit Typhus und Coli besät und nebst unbesäten Controllen in den Brutschrank gestellt. Das Resultat, das dieser Farbstoff ergiebt, ist wenig charakteristisch und bemerkenswert. Coli wächst überall besser wie Typhus, die besäten Röhrchen blassen allmählich ab, in den höheren Concentrationen entsprechend langsamer, die Controllen bleiben unverändert. Nach 10 Tagen sind alle besäten Röhrchen entfärbt, es hat sich weder eine Farbreaktion gezeigt, noch bietet das Wachstum der Bakterien irgend etwas Bemerkens-

wertes. Das Resultat ist deshalb ein so wenig versprechendes, dass der Farbstoff erst nicht mehr auf Platten versucht wird.

III. Congo und IV. Azoblau, von den Höchster Farbwerken bezogen; das erste ist ein schön roter, das letztere ein intensiv blauer Farbstoff, von guter Wasserlöslichkeit und ziemlicher Haltbarkeit. Congo entsteht folgendermassen: Wenn man ein Molekül Tetrazodiphenylchlorid auf zwei Moleküle α-Naphtylaminsulfosäure einwirken lässt, so erhält man einen roten Farbstoff, dessen Natronsalz das von Böttticher entdeckte Congo ist. Die chemische Formel desselben ist:



Das Azoblau entsteht aus Tetrazoditolyl und α-Naphtolsulfosäure; seine chemische Formel ist:



Interessant ist die Eigenschaft des Congo, dass seine Farbe in wässeriger Lösung durch die geringste Menge Säure in ein reines Blau verwandelt wird. Dies liess erwarten, dass der Säure bildende Colibacillus eine Farbenreaktion ergeben würde. Es wurde eine 1 % wässerige Lösung davon hergestellt und in derselben Weise wie früher je drei Röhrchen zu je drei ccm Kalbfleischglycerinbouillon mit 2, 3, 4, 5, 6 und 7 Tropfen dieser Farblösung gefärbt, mit Typhus und Coli besät

und mit unbesäten Controllen in den Brutschrank (36°) gestellt. Nach 24 Stunden zeigen sich folgende Veränderungen: Die Trübung in den besäten Röhrchen ist überall gleichmässig, In den geringeren Concentrationen fangen die besäten Röhrchen an etwas abzublassen, in den höheren Concentrationen von 5, 6 und 7 Tropfen besteht noch keine Farbenänderung. Ein Farbenunterschied tritt nirgends zu Tage. In allen Röhrchen auch in den Controllen zeigt sich ein 2—3 mm hoher, dunkelbraunroter Bodensatz. Nach 48 Stunden ist das Bild folgendes: Nun beginnt die Abblassung auch in den besäten Röhrchen der höheren Concentrationen, während sie in den geringen Concentrationen weiter fortschreitet, ein Farbenunterschied besteht nicht, die besäten Röhrchen sind sehr stark, Thyphus und Coli gleichmässig getrübt. Am 4. Tage zeigen die Röhrchen folgende Verhältnisse: Die Abblassung ist gleichmässig vorwärts geschritten, eine Farbenreaktion ist nicht eingetreten; sehr merkwürdig ist es, dass nun sämmtliche Typhusröhrchen ein wenig doch sichtlich stärker getrübt sind wie die Coliröhrchen. Das mikroskopische Bild im hängenden Tropfen zeigt, dass die Trübung nur auf die Menge der Bakterien zu beziehen sei. Am 5. Tage haben die Röhrchen folgendes Aussehen: In den Concentrationen von 2 und 3 Tropfen ist Typhus mehr getrübt und auch mehr abgeblasst wie Coli: die stärkere Abblassung dürfte wohl ihre Ursache in der grösseren Menge der entfärbenden Bakterien haben. In der höheren Concentration zeigt sich unter fortschreitender, ziemlich gleichmässiger Entfärbung, dass Typhus stärker wächst wie Coli; die Trübung ist eine ganz enorme; einige Röhrchen sowohl Typhus wie Coli bilden an der Oberfläche ein Häutchen; am stärksten ist der Trübungsunterschied in den Röhrchen der Concentrationen Nr. 2 und 3. Nach 6 Tagen zeigen die Congoröhrchen folgende Veränderungen: Die Entfärbung geht langsam weiter ohne charakteristischen Unterschied; Typhus ist in den Röhrchen mit geringerem

Farbeninhalt bedeutend stärker gewachsen, in den höheren Concentrationen ist der Wachstumsunterschied weniger deutlich ausgeprägt. In den nächsten Tagen ist die Entwickelung der Röhrchen folgende: Unter fortschreitender Entfärbung tritt der Wachsthumsunterschied immer deutlicher hervor, besonders in den Röhrchen mit geringerem Farbeninhalt. In den weiteren Beobachtungstagen tritt wohl als Folge des stärkeren Wachstums in den Typhusröhrchen auch stärkere Entfärbung hervor. Nach circa 14 Tagen sind die Röhrchen in den niederen Concentrationen gänzlich, in den höheren fast farblos. Der Wachstumsunterschied ist derselbe geblieben, die Trübung ist noch ganz enorm und es hat sich überall ein 1–2 mm hoher heller Bakterienniederschlag gebildet. Die unbesäten Controllen haben sich bis auf den am 2. Tage eingetretenen Farbenniederschlag in der ganzen Zeit nicht verändert. Fassen wir das Resultat dieses Versuches kurz zusammen, so haben wir als bemerkenswert folgendes hervorzuheben. Farbendifferenzen von Belang sind nicht aufgetreten, dagegen hat sich Congo als ein Farbstoff erwiesen, der sich sehr langsam entfärbt. Eine weit grössere Beachtung verdienen die Wachstumsverhältnisse des Typhus- und Colibacillus. Es hat sich mit grosser Deutlichkeit gezeigt, dass ein Zusatz am besten von 2—3 Tropfen einer 1 % wässerigen Congolösung zu 3 ccm Kalbfleischglycerinbouillon den Typhusbacillus bedeutend besser gedeihen lässt als das Bacterium coli. Wie hat man dieses Resultat aufzufassen? Ist Bacterium coli im Wachstum gehemmt worden? Ich kann es nicht annehmen, dafür ist die Trübung der Coliröhrchen zu stark; ich möchte lieber glauben, dass durch den Farbenzusatz nur der Typhusbacillus einen sehr starken Wachstumsantrieb erhält. Ist nun aber der Farbstoff als solcher das wirksame? Diese Frage meine ich verneinen zu müssen; denn der Wachstumsunterschied tritt erst mit der Entfärbung, d. h. mit der allmäligen Ausschaltung des Farbstoffes und dann um so deutlicher zu Tage. Wir

müssen also annehmen, dass etwa durch Stoffwechselprodukte der Bakterien mit dem Farbstoff chemische Umsetzungen zu stande kommen, die einen neuen Körper entstehen lassen, welcher die genannten Eigenschaften hat. Es wurde vermutet, dass dies die α—Napthtylaminsulfosäure sei und versucht schwefelsaures α—Naphtylamin anzuwenden. Jedoch die Unlöslichkeit dieses Körpers in Wasser schloss seine Verwertung aus.

Ein als Congorot bezeichneter, wohl identischer Farbstoff, welcher von Riedel, Berlin bezogen worden war und in derselben Weise versucht wurde, ergab im Grossen und Ganzen dasselbe Resultat.

Gespannt war ich auf die Wirksamkeit, welche Congo in Gelatineplatten haben würde. Es wurden Platten von Kalbfleischglycerinegelatine (vergl. oben) von schwach natursauer Reaktion mit Congo gefärbt und zwar entsprechend der bei der Bouillon günstigsten Concentration, indem je 5 ccm der Gelatine mit 4 Tropfen Congo vermischt werden. Es werden so eine Platte mit Typhus, eine mit Coli, und eine Platte mit Typhus+Coli von einer 24 stündigen Bouilloncultur aus besät. Am nächsten Tage zeigten sich als minimale Pünktchen kleine Typhuskolonien, während die Colikolonien schon deutlich erkennbar waren. Am 3. Tage ist das Bild der Platten folgendes: Typhus bildet kleine, kreisrunde, stark lichtbrechende, helle Kolonien mit leicht bläulichem Schimmer, Coli grosse granulierte, wenig durchsichtige, graubraune Kolonien. Der Unterschied zwischen Typhus und Coli ist eklatant. Doch gerade so wie bei Schwarzbraun dürfte derselbe weniger auf die Färbung als auf die schwache natursaure Reaktion und die grosse Durchsichtigkeit der Gelatine zu beziehen sein. Wenn auch die Färbung mit Congo nichts Charakteristisches bietet, so müssen wir doch der Färbung des festen Nährbodens überhaupt denselben Vorzug bei mikroskopischer Betrachtung zugestehen, den wir gewissen gefärbten Präparaten vor ungefärbten zuerkennen

Ausserdem ist die rote Farbe, welche im mikroskopischen Bilde als wunderschöner rosa Untergrund erscheint, für das Auge äusserst angenehm. Typhus ist in den Platten recht zahlreich gewachsen, doch können wir keine Wachstumsbeförderung wie in den Bouillonröhrchen konstatieren. Zum Verständnis dieser Erscheinung müssen wir berücksichtigen, dass der Farbstoff in der Gelatine keine Veränderungen eingeht wie in der Bouillon und deshalb scheinen die Resultate in den Bouillon- und Plattenkulturen einander nicht zu widersprechen.

Das Congo sehr nahe stehende, ebenfalls zu den Azofarbstoffen gehörige Azoblau lieferte ein ähnliches ebenso interessantes Resultat. Es werden in derselben Weise wie vorher zu 3 Bouillonröhrchen (3 ccm) mit 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Tropfen einer $^1/_2\,\%$ wässerigen Lösung von Azoblau gefärbt und von den Röhrchen mit gleicher Färbungsintensität je eines mit Typhus und eines mit Coli besät, während das dritte als Controle unbesät bleibt. Sämtliche Röhrchen kommen in den Brutschrank (36°). Die Besichtigung am nächsten Tage zeigt folgendes: In den Röhrchen der geringeren Concentration ist der Farbstoff im Ausfallen begriffen und in schwarzbraunen Flocken suspendiert. In den Röhrchen No. 1–4 ist Coli bedeutend stärker getrübt und mehr abgeblasst wie Typhus, in den Röhrchen No. 5 ist nur Typhus getrübt und ziemlich abgeblasst, während Coli anscheinend unverändert ist. Makroskopisch lässt sich die Trübung des Coliröhrchens nicht beurteilen, weil der Farbstoff es undurchsichtig macht; im hängenden Tropfen zeigen sich zahlreiche Bakterien. Die Röhrchen mit der Färbungsintensität von 6 Tropfen zeigen noch keine Veränderung. Am 3. Tage geben die Röhrchen folgendes Bild: In No. 1 und 2 ist das Typhus- und Coliröhrchen fast farblos, annähernd ebenso verhalten sich die Röhrchen No. 3 und 4; in No. 5 ist Typhus mehr abgeblasst wie Coli, in No. 6 ist Typhus sehr stark abgeblasst, während Coli unverändert blieb. — Schöne Farbreaktion! Die Trübungsverhältnisse sind für

Typhus und Coli ziemlich die gleichen. Am 4. Tage sind die besäten Röhrchen No. 1—5 ganz oder beinahe farblos ohne Farbendifferenz, die Wachstumsverhältnisse sind bei Typhus und Coli gleich. In den Röhrchen No. 6 hat das Typhusröhrchen einen helleren Farbenton mit etwas rötlichem Schimmer, gegenüber dem etwas wenig abgeblassten Coliröhrchen; zugleich ist hier Typhus deutlich stärker gewachsen wie Coli. Dieses letztere Resultat, das sich in den folgenden Tagen mit grosser Deutlichkeit, aber nicht so ausgesprochen in den Röhrchen mit geringerer Färbungsintensität zeigte, schien beachtenswert. Es hat den Anschein, als ob das Azoblau in stärkeren Concentrationen das Wachstum der Typhuskeime befördert oder das Bacterium coli in der Entwickelung hindert. Deshalb wurden in derselben Weise noch stärkere Concentrationen versucht und Röhrchen mit 6, 7, 8, 9 und 10 Tropfen Azoblau ($^1/_2$ %) gefärbt und ebenso Typhus- und Colikulturen angelegt neben unbesäten Controlen. Am nächsten Tage verhalten sich die Röhrchen folgendermassen: In der Serie No. 6 und 7 fängt im Typhusröhrchen der Farbstoff an, auszufallen, das Röhrchen blasst ab, während das Coliröhrchen unverändert ist. Ebenso unverändert sind noch die stärkeren Concentrationen. Am 3. Tage ist in Concentration 6 Coli etwas mehr entfärbt und stärker getrübt wie Typhus; sowohl diese Röhrchen wie alle übrigen zeigen einen starken schwarzblauen Bodensatz; in der Serie No. 7 und 8 ist das Typhusröhrchen blasser als das Coliröhrchen. Am 4. Tage zeigt sich in der Concentration 6 Typhus stärker gewachsen und dementsprechend mehr entfärbt wie Coli; in Concentration 7 ist Typhus abgeblasst, in Coli fällt die Farbe aus, in Concentration 8 fällt im Typhusröhrchen stark die Farbe aus, in den höheren Concentrationen blauschwarzer Bodensatz ohne sonstige Veränderung; in den Coliröhrchen wird stark Gas gebildet; die kleinen Bläschen bilden an der Oberfläche, insbesondere am Rande einen feinen Schaum. Am 5. Tage haben die Röhrchen folgendes Aussehen: In der

Serie No. 6 und 7 ist Typhus stärker getrübt und eine Spur blasser wie Coli, die Röhrchen mit 8 und 9 Tropfen geben eine sehr schöne Farbenreaktion: die Typhusröhrchen sind hell lilla mit starkem blauschwarzen Bodensatz, die Farbe der Coliröhrchen ist unverändert, tief schwarzblau und undurchsichtig, daher ist auch keine Trübung in ihnen zu erkennen, doch zeigt der hängende Tropfen zahlreiche Bakterien. In der Serie No. 10 keine Farbenveränderung, Typhus und Coli ist gewachsen. Am 6. Tage zeigen die ersten 3 Concentrationen anscheinend stärkeres Wachstum von Typhus, die für Typhus charakteristische Farbenreaktion von gestern ist besonders in den Röhrchen No. 9 stark ausgesprochen; Röhrchen No. 10 wie gestern. Am folgenden 7. Tage sind die Verhältnisse dieselben nur zeigt sich in den abgeblassten Röhrchen Typhus deutlich stärker getrübt, auch am 8. Tage bleibt das Resultat dasselbe. Die Farbenreaktion, die in der Färbungsintensität von 8 und 9 Tropfen aufgetreten ist, verändert sich nun so, dass Coli zu einem dunkelblau violetten Farbenton ablasst, während Typhus hell rosa ist. In den nächsten Tagen tritt überall die stärkere Trübung der Typhusröhrchen deutlicher hervor, während die Farbenreaktionen allmälig erblassen. Fassen wir aus diesem Versuchen das Brauchbare heraus, so scheint folgendes von Bedeutung. Während uns Schwarzbraun eine charakteristische Colireaktion lieferte, giebt uns Azoblau eine charakteristische Typhusreaktion. 8—9 Tropfen einer $^1/_2\,^0/_0$ wässrigen Azoblaulösung auf 3 ccm Kalbfleischglycerinbouillon und gut durchgemischt giebt nach vier Tagen im Typhusröhrchen eine hell lilla durchsichtige Färbung, während die Colikultur dunkelblau schwarz bleibt. Diese Reaktion hält 3–4 Tage lang an. Will man die Reaktion schon in 2–3 Tagen haben, so setze man nur 5–6 Tropfen hinzu, doch ist sie lange nicht so schön und so haltbar. Was die übrigen Farbenveränderungen anlangt, so ist besonders interessant der starke blauschwarze Bodensatz, der besonders für das Typhusröhrchen charak-

teristisch ist. Dass dies der nur in minimalen Spuren vorhandene Farbstoff ist, ist durchaus nicht anzunehmen, dafür ist der Bodensatz viel zu reichlich, sondern wir können uns die Erscheinung nicht anders erklären, als dass durch ein Stoffwechselprodukt des Typhusbacillus ein neuer chemischer Körper gebildet wird, der sich durch jenen Bodensatz präsentirt. Sollte man aus der chemischen Untersuchung dieses Bodensatzes nicht eventuell einen interessanten Abschluss über die Stoffwechselprodukte des Typhusbacillus erhalten können? Die Erwartung, dass die stärkeren Concentrationen einen stärkeren Einfluss auf die Wachstumsintensität des Typhusbacillus ausüben würden, hat sich nicht bestätigt, dagegen zeigt sich auch hier dieselbe Erscheinung, dass das stärkere Wachstum des Typhusbacillus nicht durch den reinen Farbstoff bedingt wird, sondern dass auch hier wie beim Congo während der chemischen Umsetzungen, die in der Entfärbung bestehen, eine neue Substanz gebildet wird, der jene Eigenschaft zuzuschreiben ist. Möglicher Weise ist dieselbe die a-Naphtolsulfosäure, welche in diesem Farbstoff enthalten ist, wie Rawitsch-Stscherba ähnliche Eigenschaften beim a- Napthol fand.

Mit dem Azoblau wurden nun auch gefärbte Platten angelegt und zwar in der Concentration, welche jene Farbenreaktion gab. 16 Tropfen der $^1/_2\ ^0/_0$ wässerigen Farblösung auf 6 ccm der schwach natursauren Kalbfleischglyceringelatine; eine Platte wird mit Typhus, eine mit Coli und eine mit Typhus + Coli besät. Auch hier zeigt sich keinerlei Farbenveränderung, doch treten am 3. Tage auch hier jene oben erwähnten charakteristischen Unterschiede auf, welche auch der ungefärbten Gelatine zu eigen sind. Typhus ist klein, stark lichtbrechend von der Farbe der Platte, Coli dunkelbraun und gross. Ebenso werden auch Platten in derselben Weise angefertigt und besät, die mit 12 Tropfen Azoblau ($^1/_2\ ^0/_0$) und 4 Tropfen Congo ($^1/_2\ ^0/_0$) gefärbt werden. Der Unterschied zwischen Typhus und Coli ist am 3. Tage äusserst

deutlich, obschon er nur auf denselben Merkmalen beruht wie in den übrigen Platten. Doch heben sich die Unterschiede von der gefärbten Gelatine viel deutlicher ab. Auf dem für das Auge äusserst angenehmen lilla Untergrunde sehen wir Typhus in kleinen hellen, bläulich schimmernden Kolonieen leicht unterscheidbar von den grossen, graubraunen, granulierten Colikolonien. In gleicher Weise wurde eine Mischung von Azoblau und Schwarzbraun verwendet in jener Concentration, welche die typischen Typhus und Colireaktionen gab. 16 Tropfen Azoblau + 12 Tropfen Schwarzbraun auf 6 ccm der oben erwähnten Gelatine. Die Erwartung, dass in der Kolonie eine Farbenreaktion erscheinen werde, erfüllte sich nicht. Doch auch hier kommen auf dem graublauen Untergrunde die in dieser Gelatine auftretenden charakteristischen Unterscheidungsmerkmale von Typhus- und Colikolonieen schön zur Geltung. Wenn es auch mit den bisher versuchten Farben nicht gelungen ist, eine charakteristische Kolonieenfärbung in Gelatineplatten darzustellen, so erscheint das erreichte Resultat doch beachtenswert, insofern als in der That in den Platten die Unterscheidung sehr leicht möglich war. Es machte den Eindruck, dass jene schwach natursaure, absolut wasserklare Kalbfleischglyceringelatine dasselbe leistete wie die Kartoffelgelatine im besten Falle und dass die Leistungsfähigkeit der Gelatine durch geringen Farbenzusatz erhöht wurde.

Zu gleicher Zeit mit diesen Plattenversuchen wurden Versuche gemacht, welche bezweckten, das gefundene Resultat, dass ein gewisser Zusatz von Congo und von Azoblau das Wachstum des Typhusbacillus im Vergleich zum Bacterium-coli begünstige, genauer zu präcisiren. Zugleich wurde versucht, ob nicht eine Mischung von Congo und Azoblau jene Wirkung steigere. Es werden wie oben je 5 Röhrchen zu 3 ccm Kalbfleischglycerinbouillon mit 2 Tropfen Congo (1 %) andre 5 mit 6 Tropfen Azoblau $^1/_2$ % und noch weitere 5

mit 6 Tropfen Azoblau $^1/_2$ % + 2 Tropfen Congo 1 % versetzt, gut durchgemischt und je 1 Röhrchen mit Typhus, eins mit Coli und die übrigen mit Typhus + Coli besät und in den Brutschrank (36 %) gestellt. Um mit annähernd gleichen Aussaatmengen zu arbeiten, wird hier, wie in den folgenden Versuchen je eine Platinöse einer 24 stündigen Bouillonkultur ausgesät. Es sollen hiervon sowie sich in den reinen Typhus- und Coliröhrchen die Wachstumdifferenz zeigt, Platten angelegt werden in der Absicht das Wachstumverhältnis zahlenmässig auszudrücken. Nach 2 Tagen erscheinen die Typhusröhrchen stärker getrübt und nun werden von sämtlichen Röhrchen Kartoffelgelatineplatten besät, indem von jedem Röhrchen eine Platinöse entnommen mit 3 ccm Bouillon verdünnt und von der gut durchmischten Verdünnung 1 Öse auf je eine Platte von Kartoffelgelatine ausgesät wird. Die Zahl der Kolonieen in jeder Platte soll einen Rückschluss auf die Wachstumsintensität des zugehörigen Röhrchens ermöglichen. Die Kartoffelgelatine ist vorher erprobt worden und giebt einen sehr guten Unterschied der Typhus- und Colikolonieen. Nach zwei Tagen ergiebt die Untersuchung der Platten folgendes Resultat:

1. Die Platten aus den Congoröhrchen. In der Typhusplatte kommen auf das Gesichtsfeld im Durchschnit 9 Colonieen, in der Coliplatte im Durchschnitt 30. Das Wachstumsverhätniss der Typhusröhrchen zu dem Coliröhrchen beträgt hiernach Typhus : Coli = 1 : 3, also Bacterium Coli scheint trotz der scheinbar stärkeren Trübung des Typhusröhrchens doch in der Congobouillon dreimal besser zu gedeihen. Die Platten aus den drei Röhrchen mit Typhus + Coli sind enorm stark bewachsen und zeigen ein starkes Überwiegen der Typhuskolonieen. Das Verhältniss ist folgendes:

T. + C. Platte I T. + C. Platte II T. + C. Platte III
T. : C. = 2,5 : 1 T. : C. = 6,5 : 1 T. : C. = 3,5 : 1

In den mit Typhus + Coli besäten Congoröhrchen zeigt

also der Typhusbacillus ein durchschnittlich vierfaches Überwiegen.

2. Die Platten aus dem Azoblauröhrchen. In der Typhusplatte kommen auf das Gesichtsfeld im Durchschnitt 7 Colonieen, in der Coliplatte im Durchschnitt 35 Colonieen. Bacterium Coli ist also in Azoblaubouillon trotz der scheinbaren stäkeren Trübung des Typhusröhrchens ca. 5mal stärker gewachsen.

Die Platten auf den 3 mit Typhus + Coli besäten Röhrchen sind sehr stark bewachsen und zeigen ein starkes Überwiegen der Typhuskolonieen. Das Verhätnis ist folgendes:

T. + C. Platte I T. + C. Platte II T. + C. Platte III
T. : C. = 3,5 : 1 T. : C. = 2,5 : 1 T. : C. = 4 : 1

In den mit Typhus + Coli besäten Röhrchen zeigt also der Typhusbacillus im Durchschnitt ein dreimal besseres Wachstumsverhältnis wie Bacterium-Coli.

3. Die Platten aus den Congo Azoblauröhrchen. In der Typhusplatte kommen auf das Gesichtsfeld im Durchschnitt 130, in der Coliplatte im Durchschnitt 40 Colonieen. Hier ist also Bacterium Coli 2,5mal weniger gewachsen wie der Typhusbacillus. Die mit Typhus + Coli besäten Platten sind sehr stark bewachsen und zeigen ein bedeutendes Überwiegen des Typhuskolonieen und zwar in folgendem Verhältnis:

T. + C. Platte I T. + C. Platte II T. + C. Platte III
T. : C. = 6 : 1 T. : C. = 4 : 1 T. : C. = 4 : 1

In den mit Typhus + Coli besäten Röhrchen mit Congo + Azoblau hat danach Typhus im Durchschnitt fünffach die Überhand. Dies ist das Resultat das die gefärbten Bouillonkulturen am 3. Tage geben. Am 4. Tage ist das Resultat nach den zu diesem Zeitpunkt besäten Kartoffelgelatineplatten folgendes:

1. Die Platten aus Congobouillon. In der Typhusplatte kommen im Durchschnitt 4—5, in der Coliplatte 20 Colonieen auf das Gesichtsfeld. Das Wachstumsverhältnis des

Typhusröhrchens zu dem des Coliröhrchens beträgt hiernach T. : C. = 1 : 5. Die Platten aus den T. + C.-röhrchen sind nicht mehr ganz so stark bewachsen wie gestern doch immer noch unverhältnismässig stärker wie die Platten mit Typhus und Coli allein. Sie zeigen folgendes Verhältnis:

T. + C. Platte I T. + C. Platte II T. + C. Platte III
T. : C. = 1 : 3,5 T. : C. = 5,5 : 1 T. : C. = 4,5 : 1

Das T. + C.-röhrchen No. I, welches auch die geringste Abblassung zeigt, hat den Zeitpunkt des besseren Wachstums des Typhusbacillus schon überschritten. T. + C.-röhrchen No. I zeigt günstigeres, T. + C.-röhrchen No. III etwas geringeres Wachstum des Typhusbacillus.

2. Die Platten aus Azoblaubouillon. In der Typhusplatte kommen im Durchschnitt 4, in der Coliplatte 8 Colonieen auf das Gesichtsfeld. Das Wachstumsverhältnis des Typhusröhrchens zu dem des Coliröhrchens ist also T. : C. = 1 : 2. Die Platten aus den Typhus- + Coliröhrchen sind nicht mehr so stark bewachsen wie vorher. Jetzt überwiegt Typhus nirgends mehr. Das Verhältnis ist folgendes:

T. + C. Platte I T. + C. Platte II T. + C. Platte III
T. : C. = 1 : 6 T. : C. = 1 : 2 T. : C. = 1 : 1

Interessant ist es, dass hier die Röhrchen No. I und No. II schon fasst ganz entfärbt sind, während in Röhrchen No. III der Farbstoff noch im Ausfallen ist. Dies scheint auch darauf hinzudeuten, dass in den chemischen Umsetzungen der Ausfällung der wirksame Körper gebildet wird.

3. Die Platten aus Congo Azoblau-Bouillon. In der Typhusplatte kommen im Durchschnitt 2 in der Coliplatte 4 Colonieen auf das Gesichtsfeld. Der Wachstumsunterschied des Typhusröhrchens in Vergleich zum Coliröhrchen beträgt demnach T. : C. = 1 : 2. Coli bekommt also wieder die Oberhand. Die Platten aus den Typhus- und Coliröhrchen sind auch nicht mehr so stark bewachsen und zeigen folgendes Verhältnis:

T. + C. Platte I T. + C. Platte II T. + C. Platte III
T. : C. = 3,5 : 1 T. : C. = 5 : 1 T. : C. = 2 : 1

Merkwürdig ist es, dass hier in den Platten aus den Röhrchen III und I wo die Entfärbung schon ziemlich beendet ist, Typhus nicht mehr so stark gewachsen ist, wie in der Platte aus dem noch wenig entfärbten Röhrchen Nr. II Die Entfärbung geschieht hier aber dadurch, dass der Farbstoff ausfällt, was ziemlich langsam vor sich geht. Das Überwuchern des Typhusbacillus fällt aber gerade in die Zeit der Ausfällung. Es muss also wahrscheinlich in den dabei stattfindenden chemischen Umsetzungen eine Substanz gebildet werden, welche Typhus fördert und Coli hemmt. Mit der Ausfällung des Farbstoffes muss jene Substanz nun wohl chemisch verändert werden, oder mechanisch zu Boden gerissen werden, jedenfalls ist sie, wenn man ihre Existenz annimmt, nach dem Ausfallen des Farbstoffes unwirksam, was das Überwuchern des Bactorium Coli nach diesem Zeitpunkte beweist. Zugleich ist zu bemerken, dass die Typhus + Coliröhrchen mit Azoblau nun die für Typhus charakteristische oben erwähnte Reaktion geben. Sehr schön ist nun auch die Farbenreaktion in dem mit Congo + Azoblau gefärbten Bouillonröhrchen. Im Typhusröhrchen ist das Azoblau ausgefallen und das Congo, das ziemlich widerstandsfähig ist, als leuchtend rote Farbe zurückgeblieben. Das Coliröhrchen ist unverändert dunkelblauviolett. Auch die Typhus- + Coliröhrchen geben mehr oder minder deutlich die schöne für Typhus charakteristische Farbenreaktion.

Also hier kann man aus dem Auftreten der roten Färbung des Röhrchen allein schon die Anwesenheit von Typhusbacillen diagnosticieren. Vielleicht kann dies ein brauchbares diagnostisches Moment abgeben. Überhaupt erscheint das mit Congoazoblau Bouillon erzielte Resultat so beachtenswert, dass der Versuch wiederholt wird, um das Resultat sicher zu stellen. Es werden wieder 5 Bouillonröhrchen in derselben Weise wie vorher mit

Congoazoblau gefärbt und in gleichem Mengenverhältnis mit Typhus, Coli und Typhus + Coli besät, nämlich mit je einer Öse aus einer 48stündigen Bouillonkultur des Typhus und Colibacillus. Die Bestimmung des Wachsthumverhältnisses geschieht wieder in derselben Weise wie früher durch tägliche Aussaat gleicher Mengen der Röhrchen in Gelatineplatten Und zwar wird diesmal die oben erwähnte bewährte natursaure Kalbfleisch-Glyceringelatine mit einem Zusatze von 5 Tropfen einer $^1/_2{}^0/_0$ Congolösung auf 6 ccm Gelatine benutzt.

Es werden nach 24, 48 und 72 Stunden Platten gegossen. Die nach 24 Std. von den Röhrchen besäten Platten zeigen folgendes Resultat. In der Typhusplatte kommen auf das Gesichtsfeld ca. 3—4 Colonien, in der Coliplatte ca. 6 Colonien, Das Wachsthumverhältniss beträgt also: T : C = 2 : 3. In den Typhus + Coli-Platten ist das Verhältniss folgendes:

T + C. Platte I T + C. Platte II T + C. Platte III

T : C = 20 : 1 T : C = 20 : 1 T : C = 17 : 1

Typhus ist hier also zwanzig mal so stark gewachsen wie Coli. Die Wachstumverhältnisse in den Röhrchen nach 48 Stunden werden uns durch die zu diesem Zeitpunkte von ihnen besäten Platten in folgender Weise veranschaulicht. In der Typhusplatte kommen auf das Gesichtsfeld ca. 40 Colonien In der Coliplatte 30. Das Wachsthumverhältniss beträgt also T : C = 4 : 3.

In den Platten aus den mit Typhus und Coli besäten Röhrchen ist das Verhältnis folgendes.

T + C Platte I T + C Platte II T + C Platte III

T : C = 5 : 1 T : C = 7 : 1 T : C = 7 : 1

Typhus ist hier also 6,5 mal stärker gewachsen als Coli, doch hat sein Wachsthum schon stark abgenommen.

Nach 72 Stunden sind die Wachsthumsverhältnisse der Röhrchen, durch die Platten veranschaulicht, folgende: In der Typhusplatte kommen auf das Gesichtsfeld ca. 4 Colonien in der Coliplatte 20 : T : C = 1 : 5. In den Platten aus den

mit Typhus und Coli besäten Röhrchen haben wir folgendes Verhältniss:

T + C Platte I	T + C Platte II	T + C Platte III
T : C = 2 : 1	T : C = 1 : 100	T : C = 1 : 100

Das günstige Resultat, das in dem Röhrchen No. 1 zu Tage tritt, lässt sich dadurch erklären, dass der Farbstoff hier noch im Ausfallen begriffen ist, während in den Röhrchen No. II u. III das Azoblau schon völlig niedergeschlagen ist und daher die Röhrchen die schöne hellrote Typhusreaktion geben.

Wir sehen, dass dieser Versuch mit Congo-Azoblaubouillon ziemlich gut mit dem ersten übereinstimmt. Die hier zu Tage getretenen Erscheinungen sind recht beachtenswert, und können vielleicht den Weg weisen zu einem Anreicherungsverfahren, dass für die Untersuchung typhusverdächtigen Wassers brauchbar wäre.

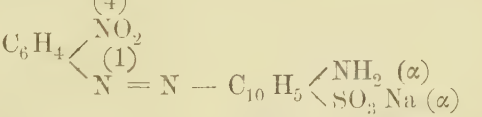
Nachdem so anscheinend ein Nährboden gefunden war, in dem der Typhusbacillus zu einer gewissen Zeit den Colibacillus um das 20fache überwucherte, wurden neue Versuche angestellt, durch blossen Farbenzusatz das Wachstum der Typhus- und Colikolonien charakteristisch zu gestalten, ohne auf die schwerkontrolierbaren Eigenschaften der Gelatine an sich angewiesen zu sein. Es wurde eine neue Gelatine aus Kalbfleischglycerinbouillon hergestellt, dieselbe ganz klar filtriert, jedoch auf den Säuregrad weniger geachtet, die Gelatine ist nahezu neutral und dies bewirkt ein grösseres Auswachsen der Typhuskolonien, womit ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal verloren geht.

Es wurden nun folgende Farbstoffe versucht:

5. Safranin M extra, bezogen von der Chem. Fabrik Menselwitz, ein scharlachroter, der grossen Gruppe der Safranine zugehöriger Farbstoff, leicht wasserlöslich und in der Lösung ziemlich haltbar. Es werden mit 10 Tropfen einer $\frac{1}{2}\%$ wässrigen Lösung 6 ccm Gelatine gefärbt und davon je

eine Typhus- und eine Coliplatte gegossen. Nach 2 Tagen sind die Typhuscolonien als kleine runde Wassertropfen gewachsen, ziemlich gut unterscheidbar von den grossen graubraunen Colikolonien: Derselbe Unterschied wie in ungefärbter schwach natursaurer Gelatine. Nach weiteren 2 Tagen verwischt sich der Unterschied, indem die Tyhuskolonien weiter auswachsen und an Grösse und Farbe den Colikolonieen ähnlich werden. Zugleich tritt aber allmählich eine Farbenreaktion auf, welche am 5. Tage am schönsten ist; die Colikolonien haben sich intensiv dunkelblutrot gefärbt, sodass sie von dem hellroten Grunde im mikroskopischen Bilde deutlich abstechen. Die Typhuskolonieen haben sich auch gefärbt, jedoch bedeutend weniger und haben den Farbstoff mehr in der Mitte ausgeschieden.

6. Naphtionrot, von Schering in Berlin bezogen, dunkelroter, wasserlöslicher Farbstoff; das Natriumssalz des p. Nitroazobenzol-sulfo-α-Naphtylamin.



Mit 10 Tropfen werden je 6 ccm der Gelatine gefärbt und Typhus- und Coliplatten angelegt. Nach 2 Tagen ist das Bild das gewöhnliche und noch keine Farbenveränderung eingetreten. Nach 4 Tagen tritt allmählich Färbung ein, welche am 5. und 6. Tage noch deutlicher wird: Die meisten Typhuskolonien haben sich in der Mitte rotbraun gefärbt, während die Colikolonien ihre gewöhnliche graubraune Farbe haben. Das Resultat erscheint nicht recht brauchbar, da nicht sämmtliche Typhuskolonieen das genannte Verhalten zeigen.

7. Fluorescenzviolett. (Höchster Farbwerke) 10 Tropfen einer $^1/_2$ % wässrigen Lösung machen den Nährboden unbrauchbar. Weder Typhus noch Coli wachsen in der damit gefärbten Gelatine.

8. Echtrot A aus der Badischen Anilin- u. Sodafabrik zu Ludwigshafen a. M. Die $^1/_2$ % wässrige Lösung, welche bald nach dem Sterilisieren gebraucht wurde ist am nächsten Tage verdorben und zu einer Gallerte erstarrt. Es ist ein rotbrauner Farbstoff, das Natriumsalz des Sulfo-α-azo-naphtalin-β-naphtol:

$$C_{10}H_5\begin{matrix}(\alpha)\\SO_3\ Na\\(\alpha)\end{matrix}N = N - C_{10}H_5OH(\beta).$$

Es werden mit 15 Tropfen der $^1/_2$ % wässrigen Lösung je 6 ccm Gelatine gefärbt und Typhus- und Coliplatten hergestellt. In den ersten 3 Tagen das gewöhnliche Bild. Am 4 Tage und deutlicher an den folgenden Tagen sind sowohl die Typhus- wie die Colikolonieen rötlich gefärbt. Ein charakteristischer Farbenunterschied besteht nicht.

9. Alkaliblau von der chemischen Fabrik in Meuselwitz bezogen gehört zu der Gruppe der Rosaniline ein schön blauer Farbstoff von beschränkter Wasserlöslichkeit. In einer Concentration von 10 Tropfen auf 6 ccm Gelatine zugesetzt, wächst Typhus und Coli zunächst wie gewöhnlich ohne charakteristische Färbung. Später nach 5—6 Tagen werden die Colikolonieen graugrün, wohl eine Combination ihrer eigenen graubraunen Farbe mit dem Blau.

10. Irisblau ein flüssiger blauvioletter Farbstoff von der Badischen Anilin und Sodafabrik in Ludwigshafen bezogen. 15 Tropfen einer $^1/_2$ % wässrigen Lösung auf 6 ccm Gelatine. Der Farbstoff scheidet sich in feinen violetten Fäserchen aus, sodass wir das Bild ungefärbter Culturen haben.

11. Anilingelb von Grübler, Leipzig bezogen, ist salzsaures Amidoazobenzol:

$$C_6H_5\overset{(1)}{-}N=N\overset{(4)}{-}C_6H_4\ .\ NH_2\ .\ HCl.$$

ist gegen Säure sehr empfindlich, welche in geringster Menge schon den gelben Farbstoff in einen roten verwandelt. 20 Tropfen der concentrierten wässrigen Lösung auf 6 ccm Gelatine.

Nach 4 Tagen haben sich sowohl die Typhus- wie die Colikolonieen intensiv gelb gefärbt ohne Farbenunterschied. Die Erwartung, dass die grosse Säureempfindlichkeit des Farbstoffes eine Reaktion in der Kolonie geben werde, hat sich nicht erfüllt.

12. Fluoresceïn von Grübler in Leipzig bezogen gehört zu den Phtaleinen und ist ein Resorcinderivat, ist nur in alkalischer Lösung zu erhalten, und ist in dieser stark dichroitisch bei durchfallendem Lichte gelbbraun, bei auffallendem intensiv grün. Es wird eine $^1/_2$ % wässrige Lösung dargestellt mittels Zusatz von 8 Tropfen concentrierter Natriumcarbonatlösung auf 20 ccm. 10 Tropfen dieser Lösung auf 6 ccm Gelatine. Zunächst kein Farbenunterschied zwischen Coli und Typhus. Erst nach 4 Tagen heben sich die Colikolonieen grün von dem gelben Grunde ab. Die Typhuskolonieen sind ziemlich gross, wohl wegen der Alkalescenz der Farblösung und zunächst farblos oder von leicht graubrauner Farbe. Später werden auch sie meist grün. Diese zeitweise recht schöne Farbenerscheinung ist keine eigentliche Färbung, sondern beruht lediglich auf Fluorescenz und scheint deshalb nicht konstant genug, um ein brauchbares diagnostisches Hilfsmittel abzugeben, da die grössere oder geringere Durchsichtigkeit der Kolonieen, auf der die Fluorescenz basiert, doch zu variabel ist.

13. Ponceau 5R gehört zu den Azofarbstoffen und ist das Natriumsalz des Azobenzol-azo-trisulfo-β-Naphtol

$$C_6H_5 - N = N - C_6H_4 - N = N - C_{10}H_5 \begin{matrix} OH(\beta) \\ (SO_3Na)_3 \end{matrix}$$

Ponceau 5R (Höchster Farbwerke) ist ein scharlachroter, leicht wasserlöslicher Farbstoff. 20 Tropfen einer $^1/_2$ % wässrigen Lösung werden zu je 6 ccm Gelatine zugesetzt und Typhus und Colikulturen angelegt. Nach 4 Tagen bildet Typhus intensiv hochrote Kolonieen auf rosa Untergrunde. Die Colikolonieen sind nicht gefärbt. Der Unterschied ist so schön, dass der Versuch wiederholt wird, und nicht nur Typhus und

Coli sondern auch 8 andere Typhus ähnliche Wasserbakterien, aus verunreinigtem Wasser rein gezüchtet, auf mit Ponceau 5R gefärbten Platten ausgesät werden. Der Erfolg ist völlig negativ trotzdem dieselbe Gelatine und dieselbe Farblösung in der gleichen Concentration angewandt wurde. In zehntägiger Beobachtungszeit tritt keinerlei Colonieenfärbung zu Tage.

14. Ponceau GG. (Höchster Farbwerke) ein dem vorigen chemisch sehr nahe stehender, hell ziegelroter Farbstoff wird in derselben Weise versucht und giebt gleichfalls kein Resultat.

15. Neutralrot (Höchster Farbwerke), ein zur Gruppe der Eurhodine gehöriger Farbstoff. Je 6 ccm Gelatine werden mit 10 Tropfen einer $^1/_2$ % wässrigen Lösung des Farbstoffes versetzt und eine Typhus- und eine Coliplatte angelegt. Der Farbstoff scheidet sich in den Platten zum Teil in rotbraunen Blättchen aus. Nach 3 Tagen erhalten wir eine charakteristische Colireaktion. Die Colikolonieen haben in der Mitte ein scharf abgegrenztes intensiv dunkelrotes Centrum, das von einem hellen Hofe umgeben ist. Von einer Fluorescenzerscheinung, wie sie Rothberger auf gefärbtem Agar beobachtet hat (Centralblatt für Bacteriologie etc. Bd. XXIV No. 14), war nichts zu bemerken. Typhus war in der Platte nicht gewachsen.

16. Indaminblau (Hoechster Farbwerke) in derselben Weise versucht, ergab keinen Farbenunterschied zwischen Typhus und Coli. Typhus war sehr spärlich gewachsen.

17. Echtblauschwarz (Hoechst) ebenso angewandt, gab gleichfalls kein Resultat.

18. Gallocyanin (Schering, Berlin), giebt mikroskopisch keinen Farbenunterschied. Makroskopisch zeigt es sich, dass nach 5 Tagen Coli in den Oberflächenkolonien die Gelatine in seiner Umgebung entfärbt.

19. Naphtolrot (Hoechst). Typhus wächst sehr schlecht. Es zeigt sich keinerlei Farbreaktion.

20. Grün (Hoechster Farbwerke) mit Dextrin abgeschwächtes Malachitgrün ist ein leicht wasserlöslicher blau-

grüner Farbstoff von grosser Haltbarkeit. 2 Gelatineröhrchen zu 6 ccm Inhalt werden mit je 20 Tropfen der $^1/_2$ % wässrigen Farblösung gefärbt, in das eine Typhus, in das andere Coli ausgesät und in Schälchen ausgegossen. Es zeigt sich das sehr merkwürdige Resultat, dass Bacterium coli hier so gut wie gar nicht wächst. Es finden sich in der Coliplatte nach 4 Tagen nur 4 Kolonien, und was sehr bezeichnend ist, nur Oberflächenkolonien. Das Wachstum des Typhusbacillus erscheint auch zwar etwas gehemmt, doch ungleich weniger wie bei Bacterium coli. Die Typhus- sowohl wie die Colikolonien färben sich nach einigen Tagen intensiv graugrün. Dies war das erste Mal, dass sogar in der Platte eine und zwar bedeutende Wachstumsdifferenz auftrat, und dies war die Ursache, den Farbstoff in dieser Beziehung im flüssigen Nährböden zu versuchen. Es werden je 4 Röhrchen jedes zu 3 ccm Kalbfleischglycerinbouillon mit je 8, 9, 10, 11 und 12 Tropfen einer $^1/_2$ % Grünlösung versetzt. Von den Röhrchen mit gleicher Färbungsintensität werden je eins mit Typhus, eins mit Coli und die beiden andern mit 2 verschiedenen typhusähnlichen Wasserbakterienarten besät und in den Brutschrank bei 36° gestellt. Am folgenden Tage haben wir folgenden Befund. In den Concentrationen No. 7—10 ist überall nur das Typhusröhrchen getrübt. Die Röhrchen mit 11 Tropfen Grün sind noch klar. Die Concentration No. 12 zeigt folgenden Befund: Das Typhusröhrchen war nach Zusatz der Farblösung nicht gut durchgemischt worden, so dass unten eine ca $^3/_4$ cm hohe Kuppe ungefärbte Bouillon blieb. Diese Partie, welche sich allmählich durch Diffusion nur schwach gefärbt hatte, ist stark getrübt, während die darüber stehende stark gefärbte Bouillon absolut klar ist. Auch in dieser Concentration sind weder Bacterium coli noch die andern Typhusähnlichen gewachsen. Am dritten Tage ist bei den Röhrchen mit acht Tropfen auch das Coliröhrchen getrübt. Nun sind auch sämtliche Typhusröhrchen getrübt, während alle übrigen Röhrchen mit Coli und

und den typhusähnlichen Wasserbakterien völlig klar sind. Dies Resultat bleibt durch eine Beobachtungszeit von 8 Tagen dasselbe. Es hat sich also gezeigt, dass bei einem Zusatz von 9 Trpf. einer $^1/_2$ % Grünlösung an aufwärts, Bacterium coli und die beiden Wasserbakterien nicht mehr wuchsen, während Typhus nur wenig behindert wurde. Es handelte sich nun darum die obere Wachstumsgrenze des Typhusbacillus zu bestimmen. Zu diesem Zwecke wurden Röhrchen mit stärkeren Concentrationen von 13—18 Tropfen Farblösung mit Typhus besät. Am dritten Tage haben sich auch diese, mit den steigenden Concentrationen schwächer, getrübt mit Ausnahme des Röhrchens mit 18 Tropfen Farbzusatz, dass sich erst am fünften Tage schwach trübt. Am 6. Tage zeigt dies Röhrchen und in geringerem Grade das nächst niedere schon makroskopisch die Zeichen der Agglutination, ein Befund, der durch den hängenden Tropfen bestätigt wird. Zugleich werden von sämtlichen Typhusröhrchen Präparate im hängenden Tropfen untersucht, und es zeigt sich, dass in den stärkeren Concentrationen etwa von 16 Tropfen an der Farbstoff agglutinierende Wirkung hat. Das Resultat, dass Grün in einer gewissen Concentration Bacterium coli und zwei andre typhusähnliche Bacterien ausschaltet, erscheint recht merkwürdig; ob sich dies praktisch verwerten lassen wird, müssen weitere Versuche lehren. Allerdings scheint dieser Erwartung zum teil das Resultat folgenden Versuches zu widersprechen. Es wurden in 8 Röhrchen von der Concentration No. 15 normale Faeces ausgesät. Nach 2 Tagen waren alle getrübt mit Ausnahme eines, das dauernd klar blieb. Von den Röhrchen wurden Platten angelegt und es zeigte sich, dass in denselben mit Ausnahme einiger Hefekolonien, nur eine Sorte Kolonien wuchsen, die durch Traubenzuckeragar sich als Coli erwiesen. Doch war dies entschieden eine andre Sorte Coli, wie die bei meinen Versushen benutzte, sie unterschied sich von dieser dadurch, dass sie viel kleinere hellere chagrinierte sehr typhusähnliche Kolonien bildete. Es konnte

also festgestellt werden, dass nicht alle Coliarten dem Grün gegenüber jene oben erwähnte Eigenschaft besitzen. Dennoch erscheint das interessante Verhalten des Grün wohl einer weiteren Prüfung wert.

Wenn ich nun das Schlussfacit meiner Untersuchungen ziehe, so möchte ich zunächst darauf hinweisen, dass die Kürze der für eine Doktordissertation gebotenen Zeit es unmöglich machte, das interessante Thema erschöpfend zu behandeln. Dennoch erscheinen die Ergebnisse, die einige Farbstoffe lieferten, derart, dass sie eine Verwendung gefärbter Nährböden zum Nachweise des Typhusbacillus nicht ausgeschlossen erscheinen lassen, und vielleicht gelingt es einst durch weitere auf den gefundenen Resultaten basierende Untersuchungen der Lösung der Frage nach einem brauchbaren Verfahren zum Typhusnachweis einen Schritt näher zu kommen.

Zum Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geheimrat Prof. Dr. Loeffler für die gütige Überweisung der Arbeit und für die Anleitung zur Anstellung der Versuche, sowie Herrn Dr. Gehrke, Assistenten des Hygienischen Institutes, für die liebenswürdige Unterstützung dabei meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Verfasser dieser Arbeit, Carl Paul Hugo Deichsel wurde am 28. Januar 1876 zu Ostrowo geboren als Sohn des Polizei-Inspektors Carl Deichsel. Er besuchte die katholische Volksschule und das Königliche Gymnasium zu Oppeln, das er Ostern 1895 mit dem Zeugniss der Reife verliess. Er wandte sich darauf dem Studium der Medizin zu, studierte die beiden ersten Semester in Berlin und die folgenden in Greifswald, bestand am 3. März 1897 das Tentamen physicum, am 9. März 1899 das Tentamen medicum und am 13. März 1899 das Examen rigososum. Während seiner Studienzeit besuchte er die Vorlesungen, Kliniken und Curse folgender Herrn Professoren und Dozenten.

In Berlin:

Hertwig. Rawitz. Reinhardt. Waldeyer. H. Virchow.

In Greifswald:

Arndt. Ballowitz. Bonnet. Busse. Grawitz. Gebhard. Helferich. Hoffmann. Krabler. Loeffler. Mosler. Peiper. Pernice. Schirmer. Strübing. Tilmann.

Allen diesen seinen hochverehrten Lehrern spricht Verfasser seinen aufrichtigen Dank aus.